

Санкт-Петербургский государственный университет

Джелали Полина Александровна

Митохондриальная изменчивость планктонных беспозвоночных морских изолятов

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки бакалавриата
основная образовательная программа 06.03.01 – «биология»

Работа выполнена на кафедре
ихтиологии и гидробиологии СПбГУ
(зав. кафедрой: проф., д.б.н. Максимович Н. В.)

Научный руководитель:
доцент, к.б.н., Стрелков П.П.

Санкт-Петербург

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I Обзор литературы	5
ГЛАВА II Материалы и методы	17
ГЛАВА III Результаты	27
ГЛАВА IV Обсуждение	35
ВЫВОДЫ	39
БЛАГОДАРНОСТИ	40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	41

ВВЕДЕНИЕ

Морские изоляты, иначе называемые морскими озёрами – особые, малоизученные категории морских систем. Изоляты в узком смысле термина – это полуизолированные водоемы, сообщающиеся с морем поверхностно (Strom, 1936). Примерами таких водоёмов являются губа Ивановская (северо-восточное побережье Кольского полуострова), «тресковое» озеро Огак (остров Земля Баффина), «медузовые» озера острова Млет в Адриатическом море. Если морские изоляты, как правило, встречаются в полярных и приполярных областях, то для тропиков характерны анхиалиновые водоемы (Stock et al., 1986). Они сообщаются с морем не на поверхности, а под землей — через тоннели и трещины в карсте или за счет фильтрации воды через рыхлый грунт. Примерами таких водоёмов являются озеро Медуз в архипелаге Палау, озеро Какабан на острове Калимантан и озеро Могильное на острове Кильдин – единственное анхиалиновое озеро в Арктике. Озеро Могильное сочетает в себе самые характерные признаки морских озёр, как анхиалиновых тропических так и арктических озёр-изолятов (Strelkov et al, 2014).

Традиционно, разными исследователями независимо выдвигалась гипотеза о том, что морское озеро – это древняя, изолированная, стабильная система, эволюционирующая по собственным законам. Первым это сказал в начале XX века К.М. Дерюгин (1925) об озере Могильном. Однако, по результатам последующих исследований оказалось, что озеро Могильное гораздо моложе, чем думал Дерюгин – около 1 500 лет (Митяев и др, 2008) против 10 000. Стабильность Могильного является относительной. Только за XX век стратификация вод в озере изменилась, а биоразнообразие сократилось. Также, сравнение видовых списков разных лет показывает, что в озеро могут проникать животные извне (Strelkov et al, 2014). Постулированная «древность», «стабильность» и «изолированность» других морских озёр требует уточнения.

Если географы понимают под островом участок суши, окружённый со всех сторон водой и постоянно возвышающийся над водой, то биогеографы – участок одной среды обитания организмов, окружённый со всех сторон другой средой обитания. С биогеографической точки зрения, морское озеро можно определить как остров океана. Уподобляя морские изоляты островам, мы должны обсудить гипотезу о биологической изоляции озёрных популяций от «материковых», то есть океанических. Одним из косвенных методов оценки изоляции популяций является генетический.

В литературе есть примеры генетических исследований обитателей морских озёр, в первую очередь таких «титовых» видов как атлантической трески арктических изолятов и

оз. Могильного (Zhivotovsky et al., 2015) и медуз родов *Mastigias* и *Aurelia* тропических и средиземноморских озёр (Dawson and Hamner, 2005; Schroth et al., 2002). Попыток обобщить весь объём опубликованных данных по генетике обитателей морских озёр, на сегодняшний день, не предпринималось.

Гидробиологи СПбГУ – представители научной школы Константина Михайловича Дерюгина, участвующие в исследованиях оз. Могильного с конца XIX века (Дерюгин, 1925). В последние 10 лет одним из направлений работы было описание генофондов обитателей оз. Могильного (Strelkov et al. 2007; Andreev et al. 2015, Skazina et al. 2018). В последние два года в этих работах принимал участие автор настоящей работы. Интерпретация данных по генофондам озера затруднена дефицитом сравнительных данных по сопредельным морским популяциям. Российский сектор Баренцева моря, равно как и моря Русского Севера вообще, можно образно назвать «белым пятном» на филогеографической карте океана. В частности, в Генбанке NCBI мы не нашли ни одной нуклеотидной последовательности планктонных беспозвоночных из баренцевоморских вод Кольского полуострова.

Таким образом, для проверки гипотезы об изоляции гидробионтов в морских озёрах, нам нужно обобщить литературные данные по генетике обитателей морских озёр, обобщить архивные данные Кафедры ихтиологии и гидробиологии СПбГУ, включая собственные данные, и предметно обсудить вопрос о структуре морских генофондов баренцевоморского региона.

Цель работы:

Проверить гипотезу об изоляции гидробионтов в морских озёрах.

Задачи работы:

- Обобщить литературные данные об особенностях генофондов обитателей морских озёр
- Изучить митохондриальную изменчивость избранных видов планктонных беспозвоночных *Cyanea capillata* (Linnaeus, 1758) и *Pseudocalanus acuspes* (Giesbrecht, 1881) Баренцевоморского региона, включая популяции морских изолятов оз. Могильное и губа Ивановская
- Обобщить неопубликованные данные коллектива Кафедры об особенностях генофондов обитателей озера Могильное

ГЛАВА I. Обзор литературы

В главе последовательно дается краткий обзор морских озер – малоизученной категории морских систем (1.1), обобщаются имеющиеся в литературе генетические данные о популяциях животных, обитающих в морских озерах (1.2), дается краткая характеристика оз. Могильного (1.3) и обосновывается задача комплексного исследования генофондов его обитателей.

1.1 Краткий обзор морских озёр

Морские озера – прибрежные солёные или солоноватоводные замкнутые водоёмы, населённые морской биотой. В этот круг не входят континентальные солёные озёра, пресные озёра, в которых встречаются животные морского происхождения, различные морские лагуны и лиманы. Все морские озера являются стратифицированными, многие – меромиктическими (с наличием придонной аноксии) (Gillespie and Clague, 2009).

Различают анхиалиновые озёра, которые сообщаются с морем под землёй, например, через тоннели или трещины в карсте (Stock et al., 1986), и морские изоляты, которые сообщаются с морем поверхностно, например путем затекания воды во время прилива (Strøm, 1936). Анхиалиновые озёра, в основном, приурочены к карстовым побережьям южных морей. Морские изоляты встречаются повсеместно (Gillespie and Clague, 2009). Лучше всего изучены «медузовые» анхиалиновые озера карстовых побережий Палау, Индонезии и Средиземного моря (Schroth et al, 2002; Dawson and Hamner, 2005; Gotoh et al., 2009; Maas et al., 2018), арктические «тресковые» озера — изоляты на о. Земля Баффина в Канаде (McLaren, 1969; Hardie et al., 2006; Lait et al., 2018 и оз. Могильное на о. Кильдин в Баренцевом море (Дерюгин, 1925; Novikov et al., 2006; Stroganov et al., 2011; Andreev et al., 2015; Teterina and Zhivotovsky, 2016). Озеро Могильное – единственное известное анхиалиновое озеро в Арктике. Оно сообщается с морем за счёт фильтрации воды через рыхлые земные породы (Дерюгин, 1925; рис. 1). Общими биологическими особенностями морских озёр являются относительно низкое биоразнообразие, обильный зоопланктон, а также наличие реликтовых или эндемичных форм. В тропических озёрах часто встречаются сцифоидные медузы, актинии и суберитидные губки, а в арктических – атлантическая треска. Озеро Могильное, где обитают и атлантическая треска (эндемичный подвид *Gadus morhua kildinensis* Derjugin 1920), и медузы, и актинии, и суберитидные губки, объединяет в себе самые характерные признаки морских озёр, как анхиалиновых тропических, так и арктических озёр-изолятов (Strelkov, 2014). Некоторые физические и биологические

характеристики наиболее изученных морских озер даны в таблице 1. Более подробная характеристика оз. Могильное дана в конце главы.

Таблица 1. Некоторые общие физические и биологические особенности озера Могильное и других наиболее изученных морских озер (по: Strelkov, 2014).

Регион	Арктика			Антарктика	Средиземноморье			Тропики			
Озеро	1	2*	3*	4*	5	6	7	8*	9*	10*	11
Подземная связь с морем	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Стратификация по солёности и кислороду	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Меромиксис	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
Слой розовой воды	+	?	?	-	-	-	+	+	-	-	-
Низкое биоразнообразие	+	+	+	?	?	+	+	+	?	?	+
Количественно богатый зоопланктон	+	?	+	+	-	?	+	+	+	+	-
Атлантическая треска	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Сцифоидные медузы	+	?	-	-	+	-	-	+	+	+	-
Морские анемоны	+	?	?	-	-	+	-	+	+	+	-
Суберитидные губки	+	?	?	-	?	-	-	+	+	+	+
Эндемичные и (или) реликтовые формы	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	?

Примечания:

1 — оз. Могильное, Россия; 2 — оз. Россфиорд, Норвегия; 3 — оз. Огак, Канада; 4 — оз. Бертон, Антарктика; 5 — Большое озеро, Хорватия; 6 — оз. Вульгмени, Греция; 7 — оз. Змаево око, Хорватия; 8 — оз. Ханг Ду I, Вьетнам; 9 — оз. Какабан, Индонезия; 10 — оз. Медуз, Палау. 11- Мотитои, Индонезия. Знак + или – означает наличие или отсутствие признака, ? — данные отсутствуют или противоречивы.

* Группы подобных друг другу озер.

Характерным примером морского озера-изолята в Баренцевоморском регионе может считаться третий ковш (кутовый бассейн) баренцевоморской губы Ивановской, расположенной в 200 км к востоку от оз. Могильного (рис 1). Губа Ивановская представлена тремя ковшами, соединёнными друг с другом порогами; порог, отделяющий второй и третий

ковши, осушается во время отлива. Третий ковш губы Ивановская может считаться морским озером - изолятом, так как сообщается с морем за счёт перетекания воды через порог во время приливов, является меромиктическим водоемом, по стратификации вод сходным с оз. Могильное (наши наблюдения). Можно сказать, что второй и третий ковши губы Ивановская не изучены с гидробиологической точки зрения, поскольку литературных данных по ним мы не обнаружили.

Считается, что геологический возраст большинства морских озер не велик – они сформировались после последнего оледенения в голоцене (Gillespie and Clague, 2009). Поэтому их возраст не может превышать 8000–10000 лет. Например, возраст озера Могильного оценивается в 2000 лет (Митяев и др., 2008).

Морским озёрам присущ определённый жизненный цикл. Они возникают, развиваются и исчезают. Вместе с ними эволюционируют их биосистемы. В науке сложилось понимание того, как возникают и развиваются озёра – морские изоляты на побережьях, испытывающих поднятие. По мере обмеления протоки и ослаблении водообмена между озером и морем поверхностные воды озера опресняются, а придонная бескислородная зона расширяется. После окончательного отделения от моря бывшее морское озеро может ещё долго сохранять придонную линзу солёной и лишённой кислорода воды морского происхождения (Ström, 1936). «Время жизни» такого озера - морского изолята, определяется скоростью поднятия берега. Для Кольского полуострова средние скорости поднятия в начале существования озера (голоцен) – 13-15 мм в год, а в наше время – единицы мм в год. (Митяев и др., 2008). Никакой модели долгосрочной динамики анхиалиновых озёр на сегодняшний день нет.

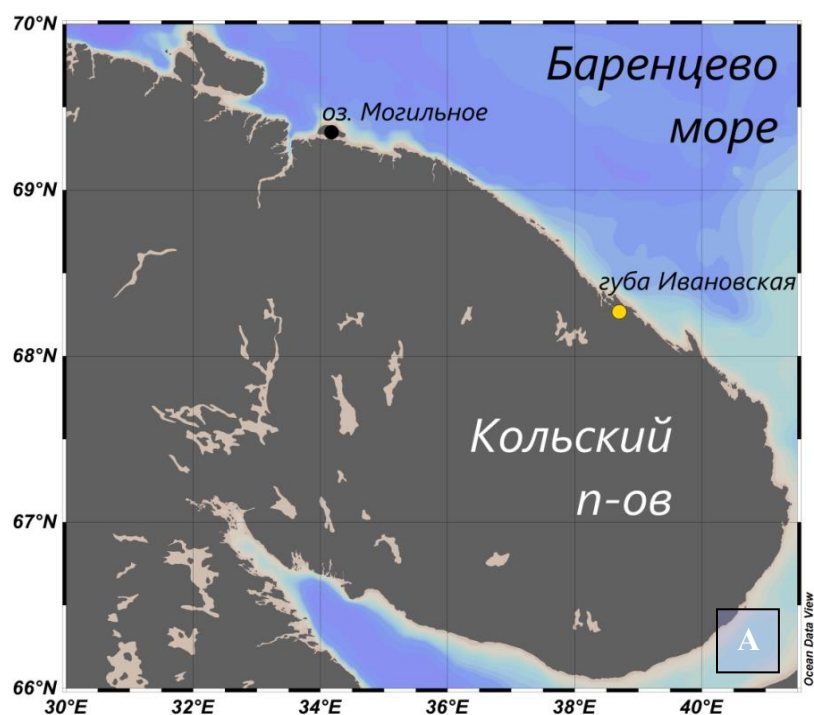


Рисунок 1. Географическое положение и внешний вид баренцевоморских морских озер - анхиалинового озера Могильное и изолята - третьего ковша губы Ивановской. **А.** Карта Кольского полуострова. Показано положение оз. Могильного и губы Ивановской. **Б.** Оз. Могильное. Вид с северного берега. Площадь озера 0.11 км^2 , мансимальная глубина 16 м. Сероводородное заражение – с 8 м глубины. **В.** Вершина губы Ивановской. Третий ковш – слева. Площадь третьего ковша – 2.5 км^2 , максимальная глубина 20 м, сероводородное заражение – с 10 м.

2.2. Генетическая изоляция в морских озёрах.

С биогеографической точки зрения (Wilson and McArthur, 1967), морские озера являются островными местообитаниями, их можно уподобить островам океана. Жизнь на острове предполагает изоляцию. Благодаря своей изолированности острова и островные местообитания оказались удобными природными моделями для экологии, биогеографии, эволюционной биологии. Уподобляя морские озёра островам, мы должны обсудить гипотезу о биологической изоляции озёрных популяций и сообществ от «материковых», то есть океанических. Одним из косвенных методов оценки изоляции популяций является генетический. С его помощью была продемонстрирована долгосрочная изоляция популяций золотых медуз Палау (Dawson and Hamner, 2005) и трески *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758) в озёрах Земли Баффина (Hardie et al., 2006). Аналогичные результаты получены и для кильдинской трески, обитающей в оз. Могильном (Novikov et al., 2006; Andreev et al., 2015).

Вопрос о степени биологической изоляции популяций морских озер исследован в недостаточной степени. Изоляция озерных популяций относительно океанических (т.е. отсутствие или ограничение генетических потоков между ними), теоретически, может обеспечиваться за счет разных механизмов (Orsini et al., 2013; Maas et al., 2018), перечисленных ниже:

- А) **Физическая изоляция**, например, непроницаемой для организмов мелкопористой перемычкой между озером и морем
- Б) **Изоляция расстоянием**, в отсутствии физических барьеров, просто в силу большого расстояния между озерными и ближайшими океаническими популяциями
- В) **Экологическая изоляция**, когда аборигены, рожденные в озере, лучше приспособлены к специфическим условиям обитания в озере, чем их морские сородичи
- Г) **«Эффект первенства»**, когда структуру генофонда определяют первые колонисты.

Если наблюдается изоляция, то она несёт следующие популяционно-генетические последствия:

1. **Дрейф генов** — снижение изменчивости в популяциях низкой эффективной численности, в том числе в популяциях, прошедших через популяционные бутылки при колонизации (эффект основателя)
2. **Естественный отбор**, как следствие, генетическая адаптация к специфическим локальным условиям и видообразование — появление новых эволюционных линий

непосредственно в морских озерах. Эволюционный возраст видов, возникших *in situ* должен быть меньше времени существования самих озёр

3. **Сохранение в озерах, как в рефугиумах, древних эволюционных линий**, некогда попавших туда, и исчезнувших в океане. Эволюционный возраст таких линий должен быть больше времени существования самих морских озёр.

При некоторых сочетаниях отбора и дрейфа, о которых спорят эволюционисты (Maug, 1954), можно ожидать видообразования – появления новых эволюционных линий и в самих морских озерах. Морские озера могут быть ценными современными моделями, или природными лабораториями, для изучения ранних этапов эволюции (Hamner, 1982). Механизмы изоляции и ранние стадии видообразования у морских животных остаются в целом неясными, поэтому очень ценны любые хорошо документированные примеры эволюционных процессов. Популяции, изолированные в морских озерах, предоставляют хорошую возможность для изучения перипатрической эволюции (т.е. эволюции малочисленных изолированных популяций) у морских таксонов, в том числе мягкотелых организмов (таких, как медузы, планктонные ракообразные и др.), редко сохраняющихся в ископаемом виде (Dawson and Hamner, 2005).

На сегодняшний день опубликованы данные о структуре генофондов следующих обитателей морских озёр: рыб *Sphaeramia orbicularis* (Cuvier, 1828) (Палау, Gotoh et al., 2009), *Atherinomorus endrachtensis* (Quoy & Gaimard, 1825) (Палау, Gotoh et al., 2011) и *Gadus morhua* (Земля Баффина, Lait et al., 2018), золотых медуз рода *Mastigias* Agassiz, 1862 (Палау, Dawson et al., 2005), сцифоидной медузы рода *Aurelia* Lamarck, 1816 (Хорватия, Schroth et al., 2002), моллюск рода *Brachidontes* Swainson, 1840 (Индонезия, Becking et al., 2016). Наиболее подробные работы посвящены таким «титовым» обитателям морских озёр, как сцифоидные медузы тропических и средиземноморских анхиалиновых озёр и атлантической треске из арктических озёр. Предваряя «метаанализ» всего объема литературных данных по генетике обитателей морских озёр, остановимся подробнее на исследованиях медуз и трески.

Исследования сцифоидных медуз. В литературе встречается всего два доказанных примера эндемичных видов беспозвоночных в морских озерах, в обоих случаях это медузы. Сцифоидные медузы *Aurelia* sp. озёр Млет (Хорватия) оказались эндемичным видом, чей возраст дивергенции (по ядерным и митохондриальным локусам) соответствует миллионам лет, что на порядок больше существования самих озёр (Schroth et al, 2002). Таким образом, озёра Млет представляют собой рефугиум для древней эволюционной линии, которая, по-видимому, вымерла в море. Иная эволюционная история у эндемичных (под-) видов золотых

медуз *Mastigias sp.* озёр Палау (Dawson and Hamner, 2005). Озёра Палау - это анхialiновые водоёмы, которые сообщаются друг с другом и с океаном через подземные трещины и каналы в толще известняка. Все озёра стратифицированы и имеют сероводородный придонный слой. Подобные анхialiновые морские озёра найдены во Вьетнаме, на индонезийских островах Калимантан и Папуа и в Хорватии. Эти удалённые друг от друга водоёмы похожи не только физическими особенностями, но и биотой (Таблица 1). Небогатая макрофауна озёр Палау включает несколько видов голотурий, моллюсков, иглокожих и рыб, а также суберитидных губок и золотых медуз. М. Доусон (Dawson, 2005) в каждом из озёр описал эндемичные разновидности медуз, которые резко отличаются по морфологии и поведению от «родительской» формы в море. В различных озёрах Палау, в зависимости от топографии, освещённости и наличия хищников, медузы имеют разное миграционное поведение. Митохондриальная дивергенция разновидностей золотых медуз в разных озёрах Палау друг от друга и от морской формы, оцененная по «баркодинговому» фрагменту COI, оказалась низкой (единичные нуклеотидные замены), что хорошо соотносится с голоценовым возрастом самих морских озер (Dawson and Hamner, 2005). Очевидно, что эндемичные формы медуз в разных озерах Палау – продукт быстрого видообразования в самих морских озёрах. Подчеркивая своеобразие эволюции *Mastigias* в морских озерах, М. Даусон и В. Хамнер (Dawson and Hamner, 2005) сравнивают их с *Catostylus mosaicus* (Quoy & Gaimard, 1824), обитающими в эстуариях Австралии. Морфологически консервативные подвиды *Catostylus mosaicus* дивергировали, по молекулярно-генетическим данным, около 1.4 миллиона лет назад, но морфологические отличия у них «не накопились» (Dawson, 2005). С точки зрения авторов, два этих примера демонстрируют недостаточное согласие между морфологическим и генетическим подходами к изучению видообразования и таксономического разнообразия.

Исследования трески. Самым знаменитым «тресковым» озером Северной Америки является озеро Огак (Земля Баффина) (Таблица 1), подробно описанное Я. Маклареном (McLaren, 1969). Несмотря на то, что в холодных водах вокруг Земли Баффина треска не встречается, в озере, где температура воды выше, она есть и достигает крупных размеров – до 1,5 м в длину и веса 30 кг. Очевидно, озерная треска в озере Огак - реликт прошлых эпох, когда климат в Арктике был теплее. Относительно недавно выяснили, что Огак – не единственное тресковое озеро в канадской Арктике. В 2003 году участники экспедиции под руководством Д. Харди описали ещё два подобных Огак морских озера на о. Земля Баффина, в которых тоже водится треска – Квазигалимник и Тариуярусик (Харди и др., 2008). Есть предварительные данные о подобных озерных «реликтовых» популяциях трески в

Гренландии и на Новой Земле (Харди и др., 2008). В ситуации, когда в море вида нет, а в озере треска есть, очевидна изоляция расстоянием озерной трески. Действительно, генетические исследования показали дивергенцию озерных популяций друг от друга и от океанической трески, обитающей в западной Атлантике; снижение изменчивости в озерных популяциях по микросателлитным локусам – 17 % (Hardie et al., 2006), по митохондриальным (полногеномные данные) – 21 % (Lait et al., 2018).

«Архетипичным» представителем тресковых морских озёр является озеро Могильное. Для кильдинской трески из озера Могильное также показана долгосрочная изоляция (Novikov et al., 2006; Andreev et al., 2015). С учетом того, что в сопредельных районах Баренцева моря треска встречается, генетическая изоляция озерной популяции, очевидно, обеспечивается физической изоляцией. Гипотеза об эволюционной дивергенции кильдинской трески, высказанная еще К.М. Дерюгиным (1925), критикуется современными авторами (Zhivotovsky et al., 2015).

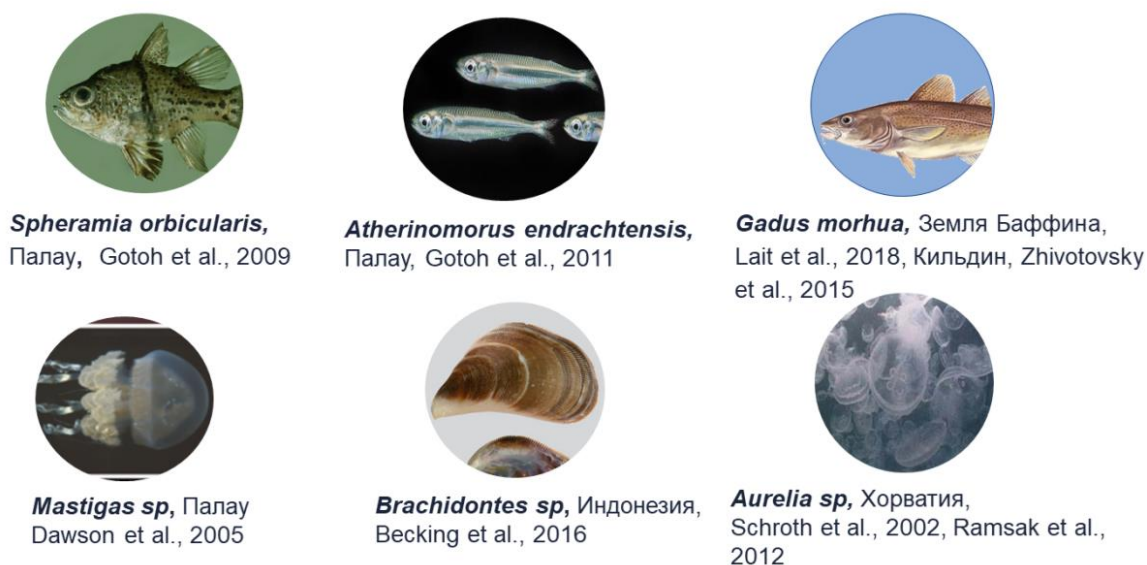


Рисунок 2. Обитатели морских озёр – объекты сравнительных (озерные, океанические популяции) исследований

Генетические особенности обитателей морских озёр. Мы обобщили всю доступную литературу по генетике обитателей морских озёр. В наглядной форме, результаты сведены в Таблицу 2, структуру которой следует пояснить. В литературе нам встретились два типа сравнений: А) когда по ядерным (ядНК) и (или) митохондриальным (Мт) маркерам

сравниваются популяции морских озер и сопредельных районов моря (сравнения обозначены «ОМ» в таблице) либо Б) между собой сравниваются популяции соседних озёр (сравнения обозначены «ОО» в таблице). Для ряда объектов генетических сравнений есть данные по морфологической дивергенции (столбец Морф.). В этом столбце «плюсом» показано наличие эволюционных различий, «минусом» - отсутствие эволюционных различий, «?» - исследования не проводились. Приводятся выводы анализа структуры генофондов озерных популяций: о пониженной изменчивости (столбец «Дрейф») и о наличии уникальной изменчивости – аллелей, не обнаруженных нигде, кроме озер. Обозначения генетических маркеров стандартные. Ситуация, когда уникальные аллели представляют «древние» филогенетические линии, чей возраст превышает возраст озер, определяется как «историческая дивергенция» (ИД).

Таблица 2. Сравнительные эволюционно-генетические исследования океанических и озёрных популяций морских животных

Сравнение (REF)	Вид, регион, водоём	Макротаксон, экологическая группа	Морф.	Генетические маркеры		Структура генофонда	
				яДНК	мтДНК	Дрейф генов	Уник. изм-ть
ОМ, ОО (Dawson and Hamner, 2005), (Dawson, 2005)	<i>Mastigias papua</i> , Микронезия, Палау, 6 озёр	Scyphozoa, Макро-планктон	+	-	COI (500 п.н.)	+	+
ОМ, ОО (Gotoh et al., 2009)	<i>Sphaeramia orbicularis</i> , Микронезия, Палау, 3 озера	Pisces, Нектон	?	-	CR (824 п.н.)	+	+
ОМ, ОО (Gotoh et al, 2011)	<i>Atherinomorus endrachtensis</i> , Палау, 5 озёр	Pisces, Нектон	?	-	MT-CYB (1141 п.н.) CR (874 – 877 п.н.)	+	+
ОМ, ОО (Hardie et al., 2006), (Lait et al., 2018)	<i>Gadus morhua</i> , Земля Баффина, 3 озера	Pisces, Нектон	+	msat	Мито-геномика	+	+
ОМ (Schroth et al, 2002)	<i>Aurelia aurita</i> , Адриатика, озера Млет	Scyphozoa, Макро-планктон	+	ITS 1/5, 8S rDNA (461 п.н.), 28S	16S (521 п.н.) COI (561 п.н)	?	ИД
ОМ, ОО (Becking et al., 2016)	<i>Brachidontes sp.</i> , Индонезия, 3 озера	Bivalvia, Макро-зообентос	+	18S (1323 п.н.) 28S (976 п.н.)	COI (516 п.н)	+	+
ОМ (Novikov et al., 2006; Stroganov et al., 2011; Andreev et al., 2015; Zhivotovsky et al., 2015; Teterina and Zhivotovsky, 2016)	<i>Gadus morhua</i> , Мурман, о. Кильдин, оз. Могильное	Pisces, Нектон	+	Msal, Allo	COI (631 п.н.), ND2 (614 п.н.)	+	+

Эффект дрейфа генов выявлен практически у всех исследованных популяций обитателей морских озёр (следует напомнить, что для *Aurelia sp.* из озёр Млет, как древней эндемичной эволюционной линии, формальный вывод об относительном уровне изменчивости сделать нельзя из-за отсутствия морского референса). Наличие уникальных аллелей также является универсальной особенностью генофондов озерных популяций. Как уже говорилось, историческая дивергенция (ИД) доказана только для *Aurelia sp.* из озера Млет.

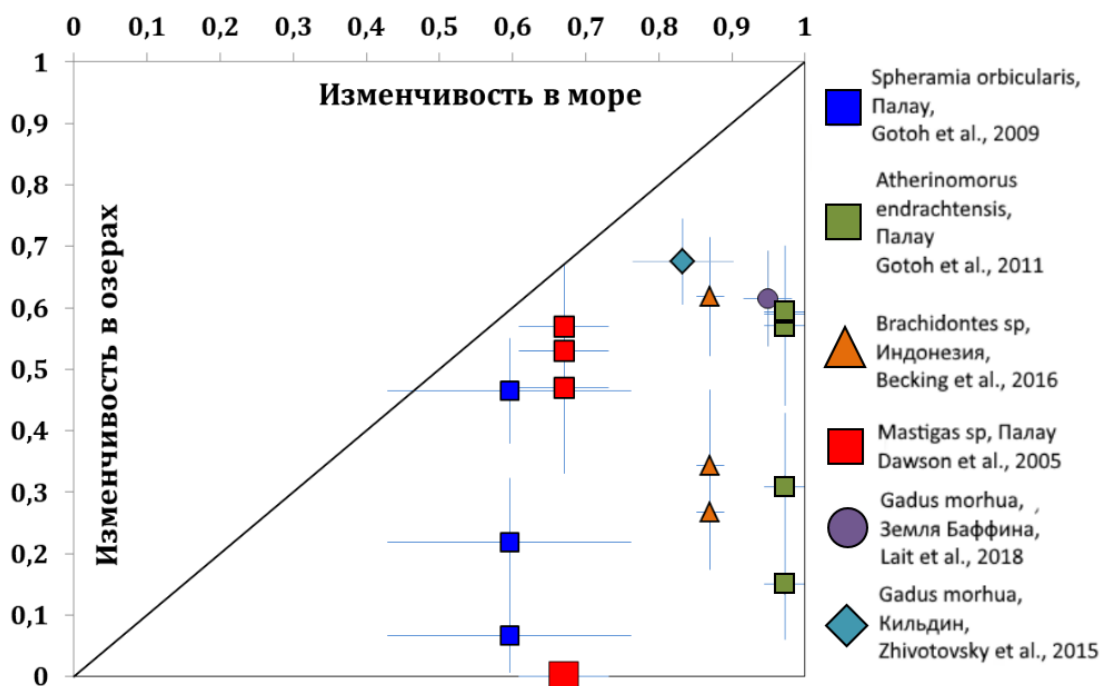


Рисунок 2. Сравнение митохондриальной изменчивости (Hd) в морских и озерных популяциях (по литературным данным). Планки погрешностей – стандартное отклонение.

В тех случаях, когда есть однотипные данные по родительским морским и озерным дочерним популяциям, мы можем провести их единообразное сравнение. На рис. 2 представлен результат сравнения популяций по митохондриальной изменчивости «баркодинговых» локусов COI или Cytb на основе литературных источников. По оси абсцисс – изменчивость в морских популяциях, по оси ординат – изменчивость в озерных популяциях тех же видов. Если бы оценки изменчивости в сравниваемых выборках совпадали, точки легли бы на диагональ. В случаях, когда изменчивость в море выше, точки лежат ниже диагонали, что и наблюдается. Для большинства объектов имеется один морской референс и несколько дочерних популяций (например, для золотых медуз разных озёр Палау), поэтому точки имеют 1 координату по оси абсцисс. По результатам анализа данных рис. 2 оказалось, что средняя потеря изменчивости в озерных популяциях относительно

океанических составляет 43 %. К обсуждению рисунка 2 мы вернемся, когда представим подробный анализ собственных данных по митохондриальной изменчивости обитателей оз. Могильного.

2.3. Озеро Могильное – архетип морских озёр

Как уже говорилось, объект нашего исследования, озеро Могильное объединяет в себе самые характерные признаки морских озёр, как анхиалиновых тропических, так и арктических озёр-изолятов. Поскольку озеро Могильное ещё и старейшее по времени открытия и изучения морское озеро (Дерюгин, 1925), его по праву можно назвать архетипом морских озёр. Напомним, что, согласно К.М. Дерюгину (1925), озеро Могильное – маленькое пресноводно-морское меромиктическое озеро (рис. 1), в котором поверхностный слой воды пресный (фактически, олигогалинный), придонный – солёный и насыщенный H_2S , а промежуточный – солёный и богатый кислородом. Верхняя граница бескислородного слоя окрашена в розовый цвет из-за массового развития фототрофных серобактерий. Морская вода попадает в озеро под землёй, просачиваясь через рыхлые земные породы на глубине 5-8 м. К.М. Дерюгиным (1925) было отмечено низкое биоразнообразие в Могильном. Озеро населяют сцифоидные медузы, актинии, губки, атлантическая треска. В планктоне сосуществуют пресноводные и морские виды, у некоторых была отмечена высокая численность. Факт сосуществования морских и пресноводных организмов в озере К.М. Дерюгин объяснял гидрологическим равновесием пресных и морских вод в озере, сохранявшимся со времени образования озера.

По геологическим данным, современное озеро Могильное образовалось из морской лагуны в первой трети субатлантической стадии голоцена. То есть 1-1,5 тысяч лет назад. Перемычка, отделяющая озеро от моря, сформировалась в результате аккумуляции осадков морскими течениями, сперва как подводная гряда, потом – морская коса (Митяев и др., 2008). Планомерные наблюдения озера Могильного продолжаются с конца 19 века по сей день, то есть около одной десятой времени его существования.

Согласно гипотезе Дерюгина (1925), «ввиду того, что озеро Могильное в течение многих тысячелетий отделено от моря, можно было бы ожидать уже теоретически возникновения в нём новых форм, то есть наблюдать процесс видообразования». Считать ли популяции некоторых или всех обитателей озера отдельными таксонами, продуктами эволюции *in situ*, на сегодняшний день вопрос научной дискуссии. Задача настоящего исследования – проверить, существуют ли озерные популяции в условиях изоляции и представляют ли собой уникальные генофонды. Ценность такого сравнения состоит в том, что оно позволяет А) судить об изоляции всего макросообщества озера, а не только его

«титულных» обитателей, таких, как треска, Б) проверить классическую гипотезу К.М. Дерюгина.

ГЛАВА II. Материалы и методы

В главе даётся описание изученного материала по морским гидробионтам – обитателям озера Могильного и Баренцева моря (собственные сборы, архивные данные Кафедры ихтиологии и гидробиологии, данные, опубликованные в Генбанке NCBI), описываются методы полевых и лабораторных исследований, а также дается обзор биоинформационных и статистических методов, использованных в работе. Мы проводим следующие анализы: (1) обобщаем данные по уровню генетической изменчивости в популяциях обитателей озера Могильного в сравнении с референсными баренцевоморскими популяциями тех же видов, (2) обобщаем собственные и литературные данные по географической изменчивости митохондриального локуса у двух наиболее подробно изученных планктонных видов.

2.1 Районы исследований и объем выборок.

Материалом для исследования послужили наши сборы планктонных беспозвоночных (7 видов: *Cyanea capillata* (Linnaeus, 1758), *Pseudocalanus acuspes* (Giesbrecht, 1881), *Pseudocalanus minutus* (Krøyer, 1845), *Pseudocalanus moultoni* Frost, 1989, *Podon leuckartii* (G.O. Sars, 1862), *Centropages hamatus* (Lilljeborg, 1853), *Pleopis polyphemoides* (Leuckart, 1859), выполненные в 2015-2018 гг. Всего было отобрано и проанализировано 16 выборок (197 особей) из пяти локальностей. Описание выборок дано в таблице 3. Кроме того, в настоящем исследовании задействованы данные опубликованных исследований, депонированные в открытом доступе в Генбанке NCBI, включающие 11 географических выборок (532 особи). Список использованного материала из опубликованных источников представлен в таблице 4. Географическое положение точек сбора материала представлено на карте (рисунок 4). Расшифровка дана в таблицах 3 и 4.

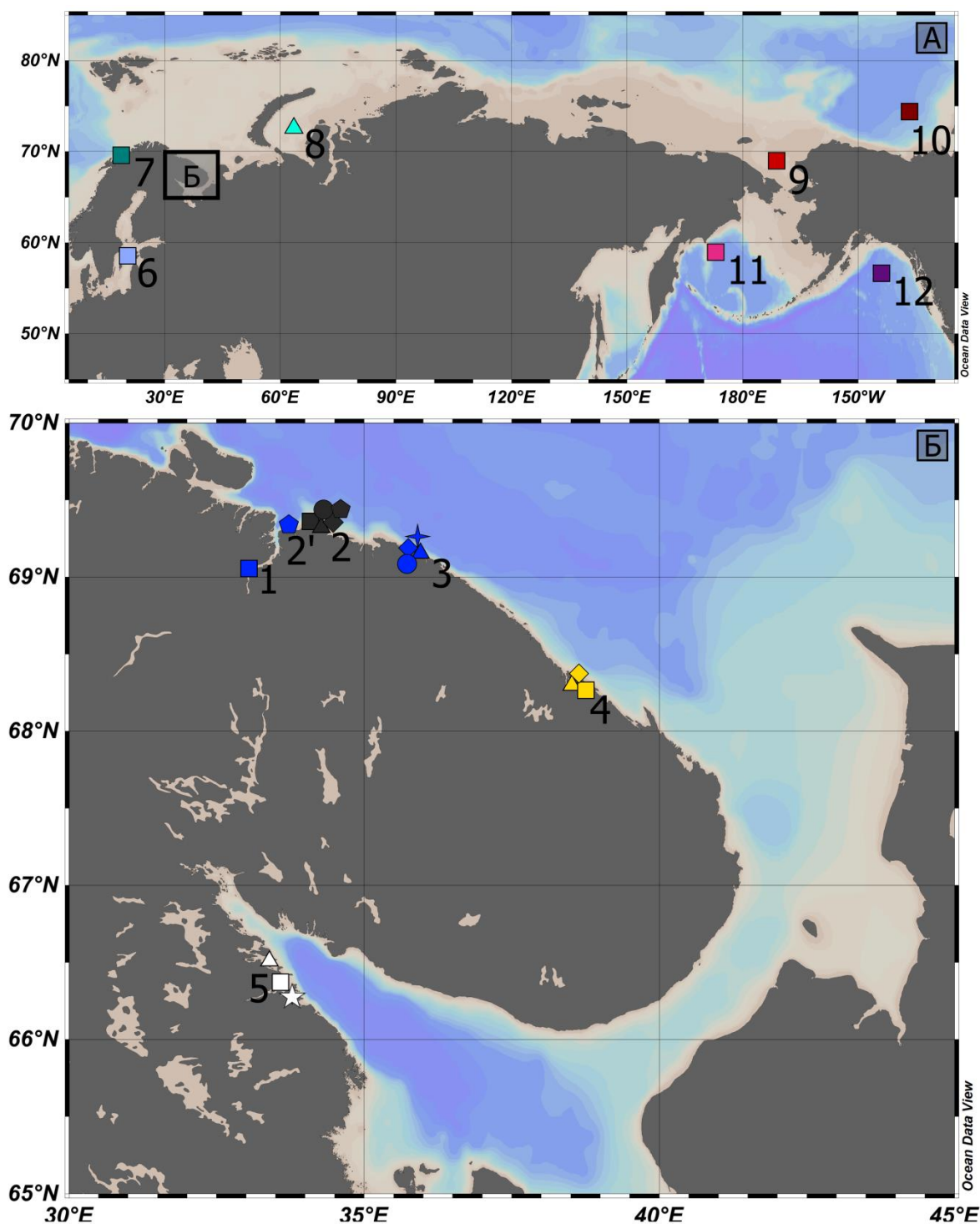


Рисунок 4. Карта мест сбора рачков и медуз для исследований полиморфизма митохондриального локуса COI. А – глобальная карта, Б – подробно Баренцевоморский регион. Места собственных сборов отмечены на карте цифрами 1, 2, 2', 3, 4, 5. Места сборов материалов, результаты которых депонированы в NCBI, отмечены цифрами 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Выборки *Pseudocalanus acuspes* отмечены квадратом, *Cyanea capillata* - треугольником, *Podon leuckartii* – ромбом, *Centropages hamatus* – кругом, *Pleopis polyphemoides* – пятиугольником, *Pseudocalanus moultoni* – четырехлучевой звездой, *Pseudocalanus minutus* – пятилучевой звездой.

Таблица 3. Места сбора и объёмы выборок планктонных беспозвоночных, изученных автором (цветом выделены выборки *Cyanea capillata* и *Pseudocalanus acuspes*). Видовая принадлежность представителей рода *Pseudocalanus* определялась при помощи ПЦР с универсальными праймерами и последующим секвенированием. Отдельно обозначены выборки из морских изолятов.

Вид	Объем выбор- ки	Локальность	Море / морской изолят	Обозначение на карте
<i>Cyanea capillata</i>	17	озеро Могильное, 69.32 с.ш., 34.35 в.д.	изолят	2
<i>Cyanea capillata</i>	15	Баренцево море, губа Ивановская, 68.27 с.ш., 34.35 в.д.	изолят	4
<i>Cyanea capillata</i>	12	Баренцево море, Дальние Зеленцы, 55.50 с.ш, 37.33 в.д	море	3
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	25	озеро Могильное, 69.32 с.ш., 34.35 в.д.	изолят	2
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	6	Баренцево море, губа Ивановская, 68.27 с.ш., 34.35 в.д.	изолят	4
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	2	Баренцево море, Абрам-мыс, 68.98 с.ш., 33.03 в.д.	море	1
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	2	Белое море, Кандалакшский зал., 66.30 с.ш., 33.61 в.д.	изолят	5
<i>Pseudocalanus minutus</i>	2	Белое море Кандалакшский зал., 66.30 с.ш., 33.61 в.д	изолят	5
<i>Pseudocalanus moultoni</i>	21	Баренцево море Дальние Зеленцы, 55.50 с.ш, 37.33 в.д	море	3
<i>Podon leuckartii</i>	21	озеро Могильное, 69.32 с.ш., 34.35 в.д.	изолят	2
<i>Podon leuckartii</i>	3	Баренцево море, губа Ивановская, 68.27 с.ш., 34.35 в.д.	изолят	4

Продолжение таблицы 3.

Вид	Объем выбор- ки	Локальность	Море / морской изолят	Обозначение на карте
<i>Podon leuckartii</i>	4	Баренцево море Дальние Зеленцы, 55.50 с.ш, 37.33 в.д	море	3
<i>Centropages hamatus</i>	19	озеро Могильное, 69.32 с.ш., 34.35 в.д.	изолят	2
<i>Centropages hamatus</i>	18	Баренцево море Дальние Зеленцы, 55.50 с.ш, 37.33 в.д	море	3
<i>Pleopis polyphemoides</i>	20	озеро Могильное, 69.32 с.ш., 34.35 в.д.	изолят	2
<i>Pleopis polyphemoides</i>	6	Баренцево море Кильдинская салма 69.30 с.ш., 34.38 в.д.	море	2'

Таблица 4. Ресурсы Генбанка NCBI по *Cyanea capillata* и *Pseudocalanus acuspes*, использованные в работе.

Вид	Объем выборки	Источник	Локальность	Обознач. на карте
<i>Cyanea capillata</i>	3	Abboud et al., 2018	Карское море	8
<i>Cyanea capillata</i>	6	Abboud et al., 2018	озеро Могильное	2
<i>Cyanea capillata</i>	6	Abboud et al., 2018	губа Ивановская, Баренцево море	4
<i>Cyanea capillata</i>	5	Abboud et al., 2018	Кандалакшский залив, Белое море	5
<i>Cyanea capillata</i>	34	Kolbasova et al., 2015	Кандалакшский залив, Белое море	5
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	52	Aarbakke et al., 2014	Балсфьорд, Норвежское море	7
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	47	Bailey, 2013	Берингово море	11
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	82	Holmborn et al., 2011	Балтийское море	6
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	4	Questel et al., 2016	Залив Аляска	12
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	185	Questel et al., 2016	Чукотское море	9
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	108	Questel et al., 2016	море Бофорта	10

Из изученных видов, только для *Pseudocalanus acuspes* и *Cyanea capillata* имеются богатые литературные данные (таблица 4), а также собственные сборы из двух морских изолятов: губы Ивановская и озера Могильное. Поэтому геногеографический анализ был проведен только на примере этих видов.

Для сравнения генетической изменчивости баренцевоморских популяций и популяций оз. Могильного, помимо собственных данных по планктонным беспозвоночным, также использованы данные, полученные коллективом кафедры ихтиологии и гидробиологии СПбГУ по следующим видам: двустворчатым моллюскам *Mytilus edulis* и *Macoma balthica*,

бентосной амфиподе *Gammarus duebeni*, рыбам маслюку *Pholis gunnelus* и треске *Gadus morhua*, паразиту трески и гаммаруса скребню *Echinorhynchus gadi* (рисунок 5).



Рисунок 5. Обитатели озера Могильное – объекты сравнительных (озёрные, океанические популяции) исследований. Красным выделены объекты, изученные с участием автора. Остальные данные предоставлены коллегами.

Рыбы генотипировались по цитохрому b (cytb), беспозвоночные по цитохромоксидазе I (COI). Структура всех данных, использованных в сравнении, показана в таблице 5. Там же приведены важнейшие экологические характеристики видов. Изученная выборка из 11 видов – обитателей оз. Могильного, включает представителей разных экологических групп гидробионтов, таким образом, характеризуя все макросообщество озера.

Таблица 5. Сравнительные эволюционно-генетические исследования популяций беспозвоночных и рыб озера Могильного

Вид	Макротаксон, экологическая группа, особенности жизненного цикла	мтДНК маркеры	Объем изученной выборки из озера, объем изученной выборки из моря Значения <i>Hd</i> для выборки из озера, из моря	
<i>Cyanea capillata</i>	Scyphozoa, Макропланктон	COI (611 п.н.)	16; 12	0; 0,3±0,16
<i>Mytilus edulus</i>	Bivalvia, Макрозообентос, планктотрофная личинка	COI	14; 18	0,6±0,09; 0,9±0,05
<i>Podon leuckartii</i>	Crustacea, Мезопланктон	COI (610 п.н.)	21; 7	0; 0
<i>Echinorhynchus gadi</i>	Archiacanthocephala, эндопаразит со сложным жизненным циклом	COI (582 п.н.)	29; 14	0; 0,914±0,047
<i>Centropages hamatus</i>	Crustacea, Мезопланктон	COI (550 п.н.)	19; 18	0,298±0,133; 0,298±0,133
<i>Pleopis polyphemoides</i>	Crustacea, Мезопланктон	COI (419 п.н.)	15; 7	0,228±0,129; 0,933±0,122
<i>Pholis gunnellus</i>	Pisces, Нектон	Cytb (666 п.н.)	18; 15	0,425±0,099; 0,8±0,113
<i>Gammarus duebeni</i>	Crustacea, Макрозообентос	COI (560 п.н.)	24; 25	0,5±0,03; 0,6± 0,06
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	Crustacea, Мезопланктон	COI (550 п.н.)	24; 40	0,561±0,038; 0,808±0,155
<i>Gadus morhua</i>	Pisces, Нектон	Cytb (631 п.н.)	30; 17	0; 0,7±0,06
<i>Macoma balthica</i>	Bivalvia, Макрозообентос, планктотрофная личинка	COI (594 п.н.)	20; 27	0; 0,8±0,06

2.2 Методы полевых исследований

Сбор представителей мезозоопланктона (*Pseudocalanus acuspes*, *Pseudocalanus minutus*, *Pseudocalanus moultoni*, *Centropages hamatus*, *Pleopis polyphemoides*, *Podon leuckartii*) проводился с помощью зоопланктонной сети Джеди с размером ячеи 180 мкм. Немедленно после сбора пробы разбирались под бинокулярным микроскопом, животные отлавливались и фиксировались индивидуально 96 % раствором этанола. Для предварительного определения животных в полевых условиях использовался полевой определитель морского планктона (Castellani, Edwards, 2017). Сбор *Cyanea* проводился с привлечением водолазов. Целая или часть особи фиксировались 96 % этанолом. Впоследствии видовая принадлежность животных уточнялась генетически, по баркодинговым участкам локуса цитохромоксидазы I (COI).

2.3 Молекулярно-генетический анализ.

Выделение ДНК. Выделение тотальной ДНК в лабораторных условиях из тканей планктонных беспозвоночных проводилось двумя методами: для *Pseudocalanus*, *Centropages hamatus*, *Pleopis polyphemoides*, *Podon leuckartii* - с помощью коммерческого набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), согласно протоколу производителя; для *Cyanea capillata* - хлороформным методом (Дрейпер и др., 1991), с изменениями.

Протокол выделения ДНК из *Cyanea capillata* был следующим:

1. К кусочку измельчённой ткани 0,5-1 мг, высушенной от спирта, добавляли 500 мкл буфера. Состав буфера на 100 мл: СТАВ (цетилтриметиламмония бромид) 2 г, ЭДТА 0,5М 4 мл, Tris HCl 1М 10 мл, NaCl 5М 28 мл, вода дистиллированная до 100 мл, и 4 мкл неразбавленной протеиназы К.
2. Пробирку инкубировали в термостате три часа при температуре 56 °С.
3. Добавляли 500 мкл хлороформа. Слегка перемешивали в течение 15 секунд.
4. Центрифугировали в течение 30 минут на скорости 6000 оборотов в минуту.
5. Переносили верхнюю фазу в чистую пробирку (примерно 450 мкл) и добавляли 300 мкл изопропилового спирта. Перемешивали в течение 20 минут.
6. Центрифугировали в течение 10 минут на скорости 14000 оборотов в минуту.
7. Супернатант сливали и добавляли 400 мкл холодного 960 этилового спирта.
8. Центрифугировали в течение 10 минут на скорости 14000 оборотов в минуту.
9. Супернатант сливали, осадок сушили в термостате на 56 °С максимум 5 минут.
10. Высушенную ДНК растворяли в 100 мкл ddH₂O.

Амплификация. Амплификация проводилась с помощью T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Для амплификации участка гена COI ~600 п.н. (*Pseudocalanus sp.*, *Centropages hamatus*, *Pleopis polyphemoides*, *Podon leuckartii*) использовались вырожденные праймеры (Costa et al., 2007):

CrustF1 GGTCWACAAAYCATAAAGAYATTGG

CrustR1 TAAACYTCAGGRTGACCRAARAAYCA .

Для *Cyanea capillata* использовались праймеры (Meyer et al., 2005):

dgHCO-2198 CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA

dgLCO-1490-tailed TGTAACGACGGCCAGTGGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG.

Состав реакционной смеси для *Cyanea capillata* приведен в таблице 6. Амплификация включала в себя предварительную денатурацию на 95 °С в течение 3 минут, далее 40 циклов: денатурация – при 95 °С в течение 15 секунд, отжиг праймеров – в течение 15 секунд при 45 °С, элонгация – 2 минуты при 72 °С. Заключительная элонгация – 2 минуты при 72 °С.

Состав реакционной смеси для видов рода *Pseudocalanus*, *Podon leuckartii* приведен в таблице 7. Состав реакционной смеси для ПЦР объемом 20 мкл (*Centropages hamatus*, *Pleopis polyphemoides*) приведён в таблице 8. Амплификация включала в себя предварительную денатурацию на 94 °С в течение 5 минут, затем 5 циклов: денатурация 30 с при 94°С, отжиг праймеров 1,5 минуты при 48 °С, элонгация 1:30 минут при 72 °С, затем 32 цикла: денатурация 30 секунд при 94 °С, отжиг праймеров 30 секунд при 51 °С и 1:30 минут при 72 °С с последующей заключительной элонгацией при 72 °С в течение 5 минут.

Таблица 6. Состав реакционной смеси для ПЦР объемом 20 мкл (*Cyanea capillata*)

Реактив	Количество, мкл
ddH ₂ O	13,2
5 * PCR buffer ScreenMix	5
F (20 пмоль/мл)	0,4
R (20 пмоль/мл)	0,4
ДНК	1

Таблица 7. Состав реакционной смеси для ПЦР объемом 20 мкл (р. *Pseudocalanus, Podon leukartii*)

Реактив	Количество, мкл
ddH ₂ O	15,5
5 * PCR buffer ScreenMix	5
F (20 пмоль/мл)	0,25
R (20 пмоль/мл)	0,25
ДНК	4

Таблица 8. Состав реакционной смеси для ПЦР объемом 20 мкл (*Centropages hamatus, Pleopis polyphemoides*)

Реактив	Количество, мкл
ddH ₂ O Thermo Fisher Scientific™	13,2
10x Taq-buffer Thermo Fisher Scientific™	5
MgCl ₂ (25 ммоль) Thermo Fisher Scientific™	0,4
dNTP (10 ммоль) Thermo Fisher Scientific™	0,4
F (10 пмоль/мл)	1
R (10 пмоль/мл)	1
Taq-полимераза Thermo Fisher Scientific™	0,1
ДНК	2

Электрофорез продуктов ПЦР. Электрофоретические исследования ПЦР-продуктов проводили в камере для горизонтального электрофореза в 1,5 % агарозном геле при напряжении 120 В в течение 30 минут. В качестве буферного раствора использовали 1хTBE (500 мл 10хTBE: 54 г Tris, 27,5 г борной кислоты, 21,92 г EDTA, до 500 мл дистиллированной воды). Размеры фрагментов ДНК определяли путём сравнения с фрагментами известной длины (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, *Thermo Scientific*™).

Секвенирование. Анализ нуклеотидных последовательностей продуктов полученных ПЦР проводился методом двустороннего капиллярного секвенирования на базе Научного парка СПбГУ.

2.4 Биоинформационный и статистический анализ данных

Редактирование и множественное выравнивание последовательностей проводилось в программных пакетах BioEdit (Hall, 1997) и Geneious 5.6.7 (Kearse et al., 2012).

Выборки характеризовались по частотам аллелей, индексу генного (гаплотипического) разнообразия Hd (Nei and Saitou, 1987) по следующей формуле:

$$d\ H = 1 - \sum_i x_i^2$$

где x_i - частота i -го аллеля.

При попарном сравнении выборок, рассчитывался показатель генетической разобщенности популяций – индекс фиксации Φ_{st} в программе DnaSP (Librado and Rozas et al., 2009). Теоретически, индекс Φ_{st} варьирует от нуля (идентичные частоты аллелей в сравниваемых выборках) до единицы (в выборках нет общих аллелей). Сравнение выборок по частотам аллелей проведено с помощью точного критерия Фишера в программе PAST 3.2 (Hammer et al., 2001).

При статистическом сравнении выборок Hd в озерных и морских популяциях (т.е. у всех 11 видов) использовался T -критерий Вилкоксона (PAST 3.2, Hammer et al., 2001).

При анализе географических данных по *Pseudocalanus* и *Syaneia*, структура изменчивости также визуализировалась с помощью кладограмм в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) (кластеризация методом ближайшего соседа, мера различий – частота нуклеотидных замен) и медианных сетей гаплотипов в программе Popart (Leigh, Bryant, 2015, метод TSC).

ГЛАВА III. Результаты

В главе последовательно представляются результаты сравнения популяций озера Могильного и Баренцева моря и результаты анализа географической изменчивости *Syaneia capillata* и *Pseudocalanus acuspes*.

3.1 Генетическая изоляция популяций озера Могильного.

Мы обобщили все доступные данные по генетике обитателей морского озера Могильного, чтобы сравнить структуру их генофондов по уровню изменчивости (генное разнообразие Hd). Значения Hd в выборках представлены в таблице 5 главы Материалы и методы.

В графической форме, результаты приведены на рисунке 5. На рисунке, по оси абсцисс отложены значения *Hd* в морских популяциях, по оси ординат – в озёрных популяциях тех же видов. В случае, когда оценки изменчивости в сравниваемых выборках совпадают, точки ложатся на диагональ. Во всем материале, такая ситуация наблюдалась только у планктонного рачка *Centropages hamatus*. В случае с планктонным рачком *Podon leuckartii* сравнение было не информативным, так как вид оказался мономорфен как озере, так и в море. У остальных рыб и беспозвоночных наблюдается тенденция к понижению изменчивости в озере. Такие виды, как *Cyanea capillata*, *Gadus morhua*, *Macoma balthica* и *Echinorhynchus gadi* мономорфны в озере, но полиморфны в море. В среднем, значения *Hd* у изученных видов в озере достоверно ниже, чем в море (*T*-критерий Вилкоксона, $p < 0,01$). Средняя потеря изменчивости у обитателей озера Могильного составляет 60 %.

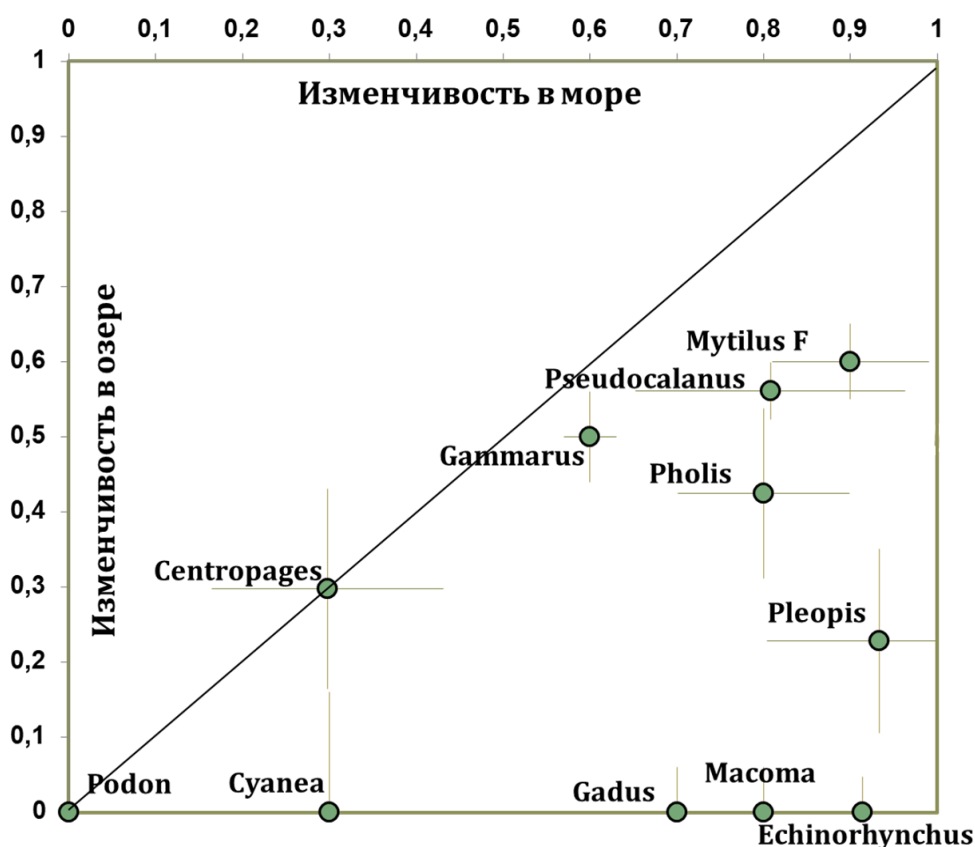


Рисунок 5. Гаплотипическая изменчивость (*Hd*) в одновидовых популяциях оз. Могильного и Баренцева моря. По оси абсцисс – изменчивость в морских популяциях, по оси ординат – изменчивость в озёрных популяциях тех же видов. В случае, когда оценки изменчивости в сравниваемых выборках совпадают, точки располагаются на диагонали. Планки погрешностей – стандартные отклонения.

3.2 Таксономическая и популяционная структура *Cyanea* северных морей.

Сравнение наших данных по медузе *Cyanea* озера Могильного, губы Ивановской и Баренцевоморского региона с данными Генбанка NCBI демонстрирует, что все они представляют одну эволюционную линию *Cyanea capillata* (рисунок 6). Другие клады, куда попадают медузы из вод восточной Пацифики (воды Аляски, Калифорнии) и беломорская *Cyanea tzetlinii*, отличаются от этой линии и друг от друга на 5-10 процентов. Ниже, мы анализируем материал из баренцевоморского региона, представляющий *Cyanea capillata*.

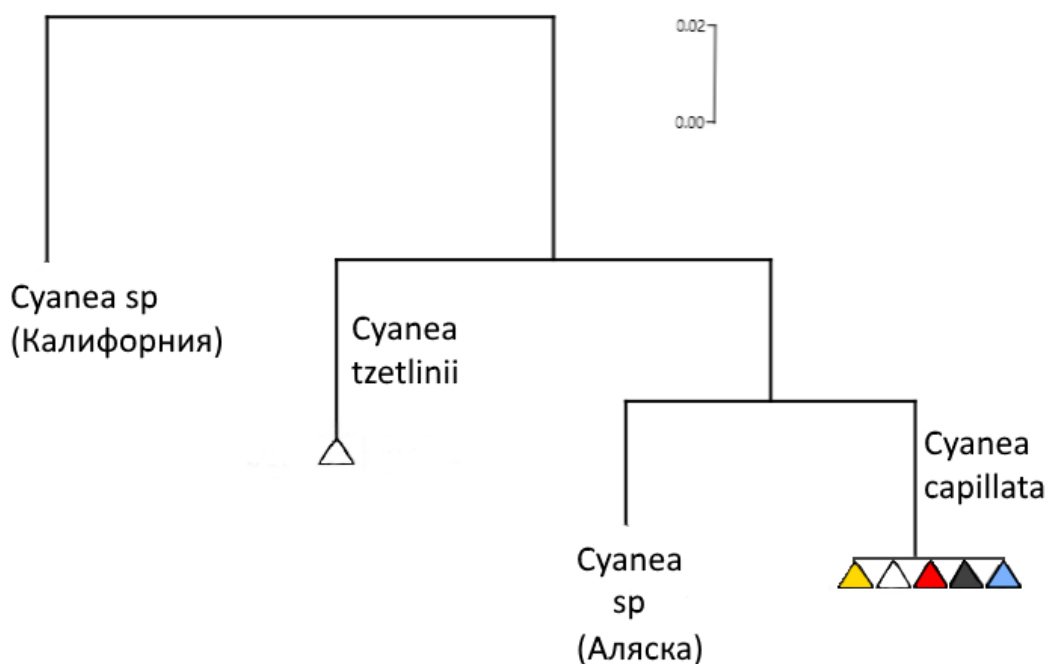


Рисунок 6. Филогенетические связи *Cyanea* (COI) северных морей (кластеризация методом ближайшего соседа, мера различий – частота нуклеотидных замен). Цветовая кодировка последовательностей из баренцевоморского региона: белый цвет – Белое море, жёлтый – губа Ивановская, синий – открытая часть Баренцева моря, красный – Карское море, черный – оз. Могильное. Индивидуальные гаплотипы, различающиеся менее чем на 1 %, не показаны.

Структуру изменчивости *Cyanea capillata* Баренцевоморского региона мы иллюстрируем медианной сетью гаплотипов (рисунок 7). Видно, что медузы в регионе имеют сложную популяционную структуру, поскольку в разных популяциях доминируют разные гаплотипы. В озере Могильном обнаружен только один («чёрный») гаплотип. В открытом Баренцевом море встречены три гаплотипа. У медуз из губы Ивановской обнаружено максимальное число гаплотипов – семь.

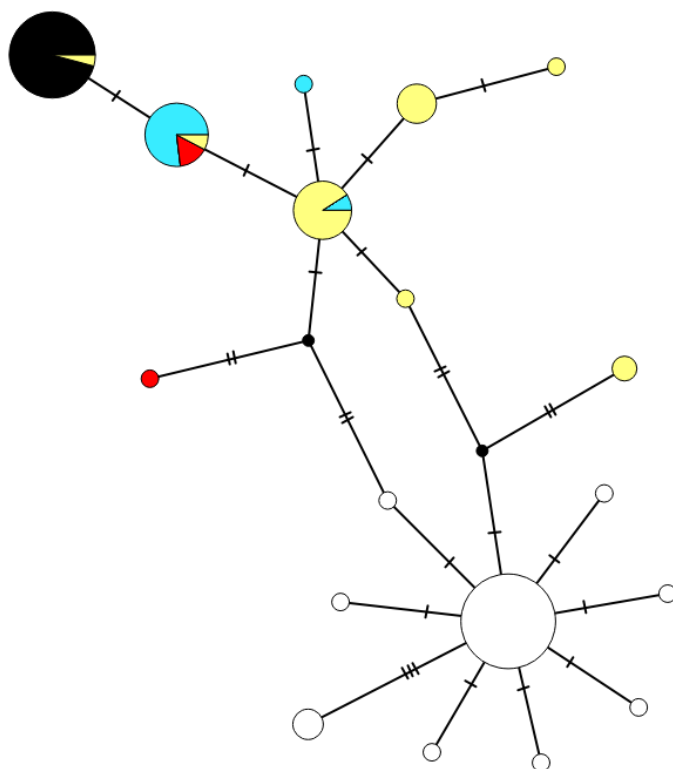


Рисунок 7. Медианная сеть гаплотипов COI *Cyanea capillata* (583 п.н.) Баренцевоморского региона по нашим и литературным (Kolbasova et al., 2015, Abboud et al., 2018) данным. На сети: каждый цветной кружок – уникальный гаплотип, размер пропорционален встречаемости в материале, а цвет кружка (сектора) – географическому происхождению (цветовая кодировка как на рис. 6). Соединительные линии – вероятные эволюционные связи, зарубки на линиях – нуклеотидные замены. Маленькие черные кружки в узлах линий – предсказанные гаплотипы.

В терминах гаплотипического разнообразия Hd , выборка из Могильного была мономорфной ($Hd=0$), а выборка из губы Ивановской демонстрировала самый высокий уровень изменчивости ($Hd=0,73$). Значения Hd в Белом море и в выборке из открытой части Баренцева моря (Дальние Зеленцы) было промежуточным (Белое море: $Hd=0,45$, Баренцево море: $Hd=0,32$) (см. также таблицу 5 главы Материалы и методы).

В попарных сравнениях, все выборки значимо отличались друг от друга по частотам аллелей (точный критерий Фишера, $p<0,05$). Значения индекса фиксации Fst между выборками были высоки, диапазон 0,4-0,9, без учета сравнений с малочисленной выборкой из Карского моря, объем которой для анализа не достаточен.

3.3 Таксономическая и популяционная структура *Pseudocalanus* северных морей.

Сравнение последовательностей COI изученных нами *Pseudocalanus* с депонированными в NCBI показало, что в нашем материале представлено три вида рода: *Pseudocalanus. acuspes*, *Pseudocalanus. minutus* и *Pseudocalanus. moultoni*. В сборах из оз. Могильного и губы Ивановской найдены только *Pseudocalanus. acuspes*, из открытой части Баренцева моря – *Pseudocalanus acuspes* и *Pseudocalanus moultoni*, а из Белого моря – *Pseudocalanus acuspes* и *Pseudocalanus. minutus*. В открытой части Баренцева моря нами было собрано всего два экземпляра *Pseudocalanus acuspes*, поэтому в качестве референса для сравнения с популяциями баренцевоморских изолятов в дальнейшем анализе выступают норвежские данные по Балсфьорду (Aarbakke et al., 2014). На рисунке 8 приведена филогения *Pseudocalanus* северных морей. Помимо *Pseudocalanus acuspes*, *Pseudocalanus minutus* и *Pseudocalanus moultoni*, в анализ включен не попавший в собственные сборы массовый вид *Pseudocalanus newmani* (данные из Kim et al., 2012). Различия в нуклеотидных последовательностях COI изученных трех видов рода *Pseudocalanus* оставляют 5-10 % (рисунок 8). У *Pseudocalanus acuspes* из Баренцевоморского региона выявлены две клады, различия между которыми составляют примерно 2 % (рисунок 8). В частности, эти клады представлены в выборках из Могильного и Ивановской.

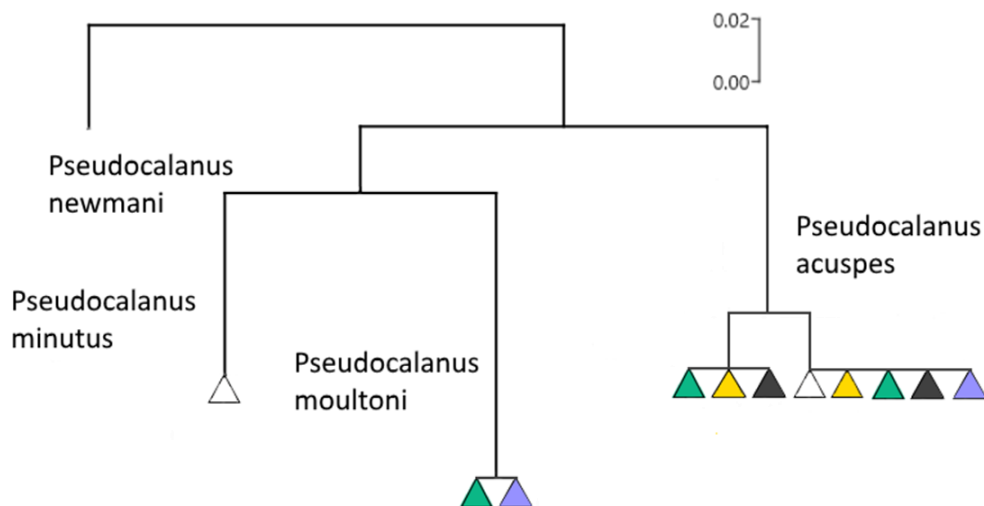


Рисунок 8 . Филогенетические связи *Pseudocalanus* (COI) северных морей (кластеризация методом ближайшего соседа, мера различий – частота нуклеотидных замен). Цветовая кодировка: белый цвет – Белое море, жёлтый – губа Ивановская, синий – открытая часть Баренцева моря, зеленый – Балсфьорд (Норвежское море), черный – оз. Могильное, голубой – Балтийское море, розовый – Берингово море, красный – Чукотское море, коричневый – море Бофорта, фиолетовый – залив Аляска. Индивидуальные гаплотипы, различающиеся менее чем на 1 %, не показаны.

Две клады, или гаплогруппы, удаленные минимум на 7 замен, хорошо видны на гаплотипической сети *Pseudocalanus acuspes* мирового океана (рисунок 9). Из двух гаплогрупп, одна, менее полиморфная, уникальна для популяций восточной Атлантики (на рисунке 9, слева). Другая, более полиморфная, представлена в популяциях Тихого океана и притихоокеанских арктических морей, с одной стороны, и - в баренцевоморском регионе, с другой (на рисунке 9, справа). Наблюдаемая высокая нуклеотидная изменчивость в Баренцевом море связана с тем, что тут встречаются обе эти линии. Для удобства сравнения выборки из баренцевоморского региона, на рисунке 10 приведена медианная сеть гаплотипов только для этого материала. В материале из Могильного и из Ивановской найдено по четыре гаплотипа. Оба изученных рачка из Баренцева моря маркированы разными гаплотипами, а оба рачка из Белого моря – одним и тем же, причем уникальным, гаплотипом.

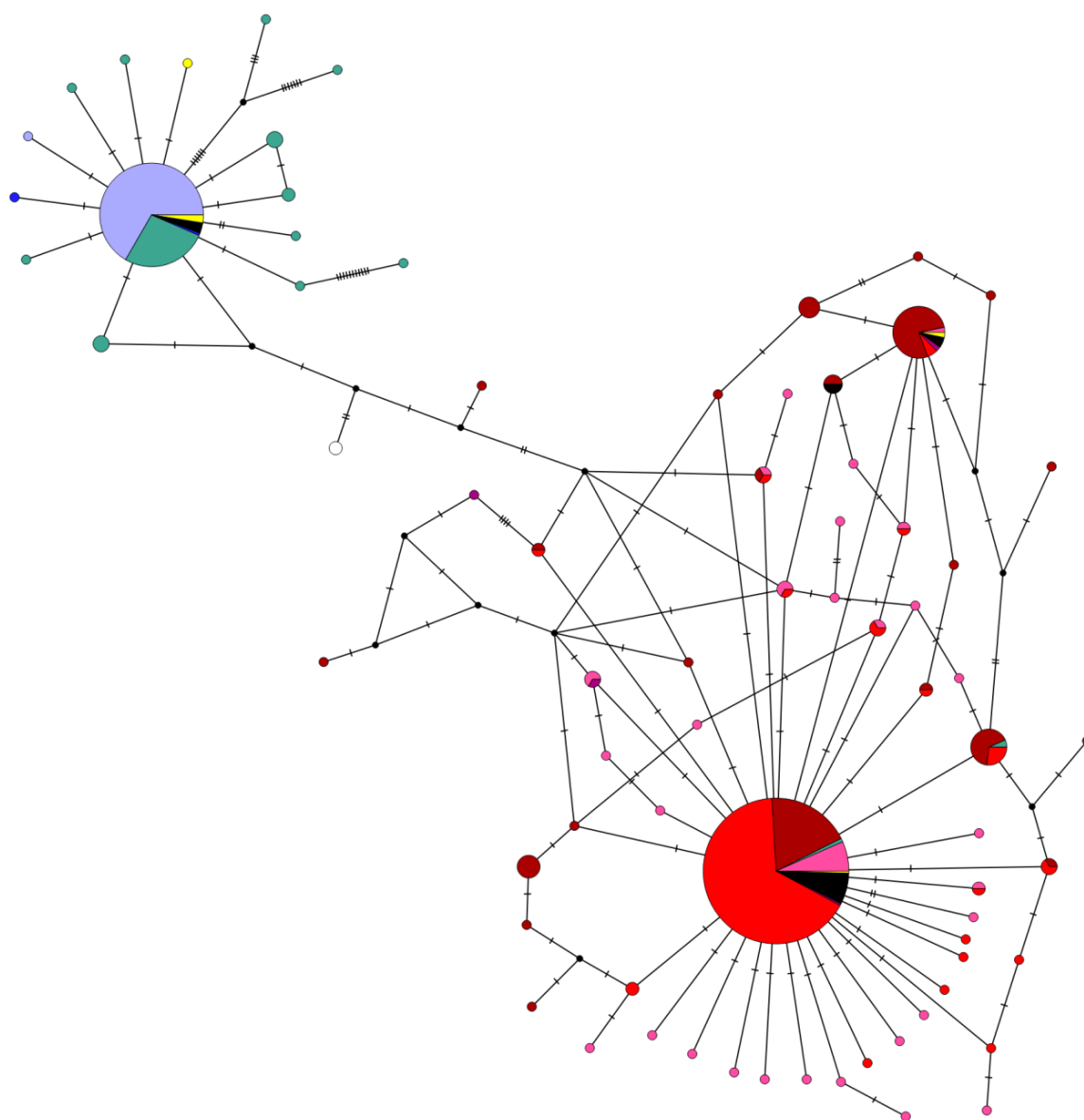


Рисунок 9. Медианная сеть гаплотипов COI *Pseudocalanus acuspes* мирового океана. Длина последовательности - 385 п.н. Кроме собственных данных, включены данные из работ: Aarbakke et al., 2014, Holmborn et al., 2011, Bailey et al., 2013 и Questel et al., 2016. Принцип построения сети – как на рисунке 7. Цветовая кодировка: голубой цвет – Балтийское море, зелёный – Балсфьорд, розовый – Берингово море, синий – Баренцево море, коричневый – море Бофорта, красный – Чукотское море, фиолетовый – залив Аляска, черный – озеро Могильное, белый – Белое море, желтый – губа Ивановская.

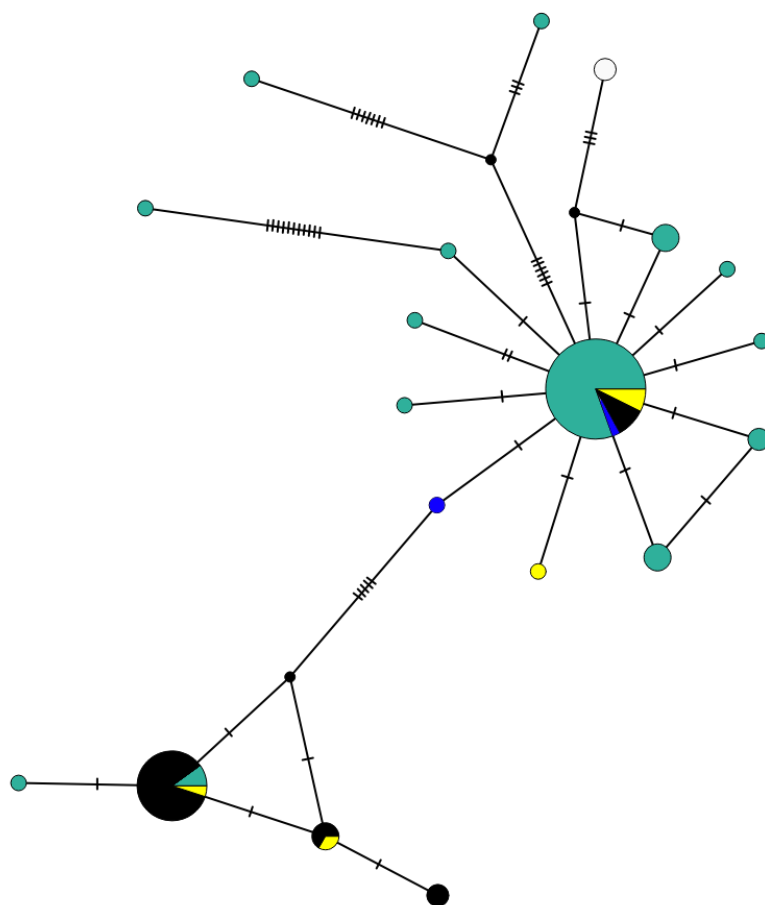


Рисунок 10. Медианная сеть гаплотипов COI *Pseudocalanus acuspes* баренцевоморского региона.

Обозначения как на рисунке 9.

При сравнении выборок по показателю генетического разнообразия Hd , выборки из Баренцева и Белого морей пришлось исключить ввиду малого числа особей ($N=2$). Значения Hd (\pm стандартное отклонение SD) в Ивановской, Балсфьорде и Могильном составляли, соответственно, $0,80 \pm 0,17$, $0,60 \pm 0,08$ и $0,57 \pm 0,13$. Как и в случае с *Syaneia*, выборка из Ивановской демонстрировала тенденцию к повышенной изменчивости. В попарных сравнениях, выборки из Ивановской и Балсфьорда значимо не отличаются друг от друга по частотам аллелей (точный критерий Фишера, $p > 0,05$), но каждая из них значимо отличается от оз. Могильного ($p < 0,05$). В терминах индекса фиксации, дифференциация между выборками из Ивановской и Балсфьордом составляет $\Phi_{st} = 0,05$, между Ивановской и Могильным – $0,23$, между Могильным и Балсфьордом – $0,56$.

ГЛАВА IV. Обсуждение.

4.1 Генетическая изоляция популяций морских озёр

Ранее опубликованные работы по генетике генофондов морских озёр, в основном, были посвящены «титульным» (крупным, массовым, привлекательным для публики) представителям фауны, таким, как медузы или крупные *Mytilidae* тропических и субтропических озёр и треска арктических озёр (Dawson and Hamner, 2005; Gotoh et al., 2009; Gotoh et al., 2011; Zhivotovsky et al., 2015; Becking et al., 2016; Lait et al., 2018). Мы впервые обобщили результаты этих исследований, сопоставив оценки митохондриальной изменчивости в озерных и «референсных» морских популяциях изученных видов (см. рисунок 3 главы Обзор литературы). Во всех, без исключения, случаях, уровень изменчивости в озерных популяциях был ниже, чем в морских популяциях, в среднем, на ~43 %. Можно сделать вывод, что популяции массовых крупных животных в морских озёрах существуют в условиях относительной изоляции. Можно ли данные по «титульным» видам экстраполировать на все макросообщество водоема?

Мы предприняли попытку ответить на вопрос, в какой степени макросообщество морского озера изолировано от морских сообществ, проанализировав структуру генофондов 11 обитателей оз. Могильного в сравнении с морскими популяциями тех же видов. Изученные животные представляют разные репродуктивные стратегии (наличие и отсутствие пелагической личинки в жизненном цикле), жизненные формы (бентос, планктон, нектон) и трофические уровни (консументы разных порядков, паразит, фильтраторы) и объективно представляют животное макросообщество озера, насчитывающее всего порядка 50 видов (Strelkov et al. 2014). Один из исследованных видов (*Podon leuckartii*), несмотря на большой объём выборки, оказался мономорфным и в озере, и в море. Данные по остальным видам можно использовать в сравнении. Снижение генетической изменчивости в озёрных популяциях относительно морских, в среднем, оказалось равным 60 %. За этим средним значением стоит большой разброс в данных. У *Centropages hamatus* оказался одинаковый уровень гаплотипической изменчивости в озере и в море. *Cyanea capillata*, *Gadus morhua*, *Macoma balthica*, *Echinorhynchus gadi* были мономорфны в озере, но полиморфны в море (формально, потеря изменчивости 100%). Интересно, что в литературе описан только один случай, когда обитатели морских озёр, при высокой митохондриальной изменчивости в море, оказались мономорфными в озере – это золотые медузы *Mastigias sp.* из некоторых озёр Палау (Dawson and Hamner, 2005). Для остальных изученных видов из озера Могильного

наблюдалась ситуация, сопоставимая с таковой у «титульных» обитателей других морских озер: гаплотипическая изменчивость снижена на несколько десятков процентов.

Потеря изменчивости в изолированной популяции под действием дрейфа – функция от времени изоляции и от эффективной численности популяции (Bromham, 2009). С одной стороны, популяции, находящиеся на ранних стадиях изоляции, характеризуются более высокой изменчивостью, чем популяции той же численности на более поздних стадиях изоляции. С другой стороны, многочисленные популяции теряют изменчивость медленнее, чем малочисленные. С этими факторами – разное время изоляции (в том числе в терминах числа поколений) и разная эффективная численность – теоретически могут быть связаны различия в степени потери изменчивости у разных обитателей озера Могильного. Еще один источник варьирования – ошибка выборочного наблюдения: объемы выборок не всегда достаточно велики для надежных оценок. Объема имеющихся данных (количество видов, объемы выборок) кажется недостаточным для сравнительного анализа разных видов по степени потери изменчивости. Важно, что на этом материале удалось показать, что генофонды оз. Могильного несут отчетливый отпечаток генетического дрейфа, а значит, представляют собой малочисленные популяции, существующие в условиях изоляции. Как и предполагал К.М. Дерюгин, зооценоз озера Могильного существует в условиях изоляции. Эта изоляция, безусловно, в первую очередь обеспечивается физической преградой – мелкопористой перемычкой между озером и морем. Какую-то роль, вероятно, играют эффект основателя и сформировавшиеся за поколения жизни в водоеме генетические адаптации к обитанию в специфических условиях озера.

Традиционно принимается, что оз. Могильное – единственное морское озеро в баренцевоморском регионе (Дерюгин, 1925). В тоже время, в регионе есть и другие водоемы, подпадающие под избранное определение морского озера (полуизолированные водоемы, сообщаемые с морем поверхностно). В первую очередь это кутовые бассейны губы Ивановской, являющиеся типичными морскими изолятами. Нам удалось получить первые данные по структуре генофондов обитателей Ивановской – медузе *Suapea* и веслоногому рачку *Pseudocalanus acuspes*. Благодаря наличию этого материала в изолятах эти объекты были выбраны для более подробного анализа популяционной структуры планктонных беспозвоночных региона.

4.2 Таксономическая и популяционная структура *Suapea* северных морей

Таксономия р. *Suapea* неоднократно пересматривалась в течение прошлого столетия в связи с тем, что большинство признаков внешней морфологии, таких как цвет, структура

гастроваскулярной системы и количество щупалец, сильно варьирует не только между, но и внутри популяций (Kolbasova et al., 2015). Применение генетических методов в совокупности с традиционной таксономией (Kolbasova et al., 2015) позволило пролить свет на таксономическую структуру *Cyanea* северных морей и, в частности, обосновать выделение нового вида *Cyanea tzetlinii* в Белом море. Анализ данных по изменчивости COI «*Cyanea capillata*» северных морей в Генбанке NCBI позволяет прогнозировать разделение этого очень полиморфного вида на несколько новых видов, поскольку выявляется несколько митохондриальных клад, расходящихся на уровне 5-10 процентов.

Все изученные нами *Cyanea capillata* баренцевоморского региона представляли одну кладу, и мы рассмотрим популяционную структуру этого таксона. Было показано (Abboud et al., 2018), что для меропланктонных сцифоидных медуз (таких как *Aurelia aurita*, *Mastigias* sp. и др.) характерны высокие значения индекса фиксации ($\Phi_{st} > 0,33$) на относительно небольших (сотни километров) географических дистанциях. Полученные нами новые данные по популяционной структуре *Cyanea capillata* подтверждают эти выводы: индексы фиксации между выборками из Белого моря, открытой части Баренцева моря, Могильного и Ивановской находились в диапазоне от 0,4 до 0,9, потому что в разных популяциях доминируют разные гаплотипы. Из всех географических популяций, наиболее полиморфной оказалась популяция губы Ивановской. Это – неожиданный результат, поскольку раньше в морских озерах мы отмечали пониженную, а не повышенную изменчивость. Возможно, высокая полиморфность медуз в губе, состоящей из нескольких ковшей-бассейнов, сообщающихся через мелководные пороги, связана с ее сложной морфологией и гидрологией. Например, в разных ковшах обитают разные популяции с разными частотами гаплотипов, мы же анализировали выборку, собранную в двух разных ковшах. Также, высокая полиморфность медуз в губе может быть связана с их высокой там численностью. Мы нигде никогда не видели так много медуз, как в вершине губы Ивановской. По устным сообщениям участников экспедиции 2008 года, в тот год там наблюдалось так же много медуз, как и в 2018 г.

4.3 Таксономическая и популяционная структура *Pseudocalanus* северных морей

Каляноидные рачки рода *Pseudocalanus* являются массовыми представителями мезозoopланктона северных морей. В Белом море отмечены *Pseudocalanus acuspes* и *Pseudocalanus minutus* (Markhaseva et al., 2012), в водах северной Норвегии – *Pseudocalanus acuspes*, *Pseudocalanus moultoni*, *Pseudocalanus elongatus* и *Pseudocalanus minutus* (Aarbakke et al 2011, 2014). По норвежским данным, виды отличаются своими экологическими

предпочтениями. *Pseudocalanus acuspes* – прибрежный вид, приуроченный к холодным водам и водам с пониженной соленостью. *Pseudocalanus moultoni*, *Pseudocalanus minutus* и *Pseudocalanus elongatus* – океанические виды, из которых *Pseudocalanus elongatus* приурочен к теплым течениям, а два остальных являются эврибионтными (Aarbakke et al., 2014). Морфологическое определение видов рода трудоёмко. Генетический анализ представляет собой более надежный метод для видового определения.

В последние годы для определения видов привлекают метод, основанный на выявлении различий в баркодинговом участке локуса цитохромоксидазы I (COI). Различия в нуклеотидных последовательностях COI видов оставляют ~16 % (Bucklin et al 2003).

В сборах из оз. Могильного мы нашли *Pseudocalanus acuspes*, из Баренцева моря - *Pseudocalanus acuspes* и *Pseudocalanus moultoni*, а из Белого моря – *Pseudocalanus acuspes* и *Pseudocalanus minutus*. В российском секторе Баренцева моря *Pseudocalanus moultoni* отмечен впервые.

Уровень межвидовых отличий по нуклеотидным последовательностям COI между обнаруженными в Баренцевоморском регионе видами составил 5-10 процентов, что несколько ниже ранее опубликованных данных. (Bucklin et al 2003). Внутри изученных *Pseudocalanus acuspes* выделяются две ветви на кладограмме, расходящиеся на уровне двух процентов. В озере Могильном и губе Ивановской *Pseudocalanus acuspes* представлен обеими кладами. Существование данных филогенетических линий может свидетельствовать о начале видообразования.

Данные клады соответствуют двум гаплогруппам на гаплотипической сети (см. рисунок 9 главы Результаты). Одна уникальна для популяций восточной Атлантики. Другая представлена в популяциях Тихого океана и притихоокеанских арктических морей и в баренцевоморском регионе. Расстояние между выделяющимися гаплогруппами составляет минимум на 7 замен. Тихоокеанская гаплогруппа имеет более разветвлённую и сложную структуру, что свидетельствует о её более древнем происхождении (накоплено большее число нуклеотидных замен). Косвенно эти данные подтверждаются более высокими значениями гаплотипического разнообразия у *Pseudocalanus acuspes* из арктической Пацифики (Questel et al., 2016) – $Hd=0,66\pm0,03$ – по сравнению с норвежскими данными из Балсфьорда ($Hd=0,60\pm0,08$).

В терминах индекса фиксации, дифференциация между выборками из Ивановской и Балсфьордом была наименьшей ($\Phi_{st}=0,05$), что сходно с уровнем межпопуляционной

дифференциации у *Pseudocalanus acuspes* из других арктических морей (Чукотское море и море Бофорта) – $\Phi_{st}=0,05$ (Questel et al., 2016). Значительно более высокая генетическая разобщённость наблюдалась между рачками из озера Могильного и Балсфёрда – индекс фиксации равнялся 0,56.

ВЫВОДЫ:

- Популяции обитателей морских озёр, как правило, демонстрируют признаки изолированных генофондов, которые подверглись генетическому дрейфу.
- По результатам комплексного исследования озера Могильного можно заключить, что всё макросообщество озера существует в условиях изоляции. Средняя потеря изменчивости в озерных популяциях составляет 60%.
- На фоне данных по другим морским озёрам, предварительные данные по *Cyanea capillata* и *Pseudocalanus acuspes* морского изолята губа Ивановская являются неожиданными: в этих популяциях наблюдается не пониженная, а повышенная изменчивость.
- Пример *Cyanea capillata* показывает, что планктонные виды могут иметь в баренцевоморском регионе сложную популяционную структуру. Пример *Pseudocalanus acuspes* показывает, что планктонные виды могут иметь в баренцевоморском регионе сложную биогеографическую историю.
- Известно, что для сухопутных животных океанические острова могут служить рефугиумами для древних эволюционных линий, центрами видообразования, вместилищами изолированных, уникальных, генофондов. Анализ собственных и литературных данных демонстрирует, что тем же самым морские озёра служат для морских обитателей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность всем участникам беломорской практики СПбГУ, экспедиций 2018 года на озеро Могильное и в губу Ивановскую. Благодарю Полякову Наталью Владимировну за помощь в сборе и идентификации планктонных ракообразных.

Благодарю Гагарину Анастасию Владимировну и Сказину Марию Александровну за помощь в освоении молекулярно-генетических методов.

Выражаю признательность преподавательскому составу кафедры ихтиологии и гидробиологии СПбГУ за полученные знания.

Сухих Наталью Михайловну я благодарю за рецензирование данной работы.

Отдельную благодарность я выражаю научному руководителю, Петру Петровичу Стрелкову, за терпение, всестороннюю помощь и критические замечания при организации и написании работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке:

- 1) грантового проекта Русского Географического общества "Колыбельная трескового озера. Документация экосистемы озера Могильного (о. Кильдин, Баренцево море)"
- 2) гранта Российского фонда фундаментальных исследований 16-04-00723-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дерюгин, К. М. (1925). Реликтовое озеро Могильное (остров Кильдин в Баренцевом море). *Тр. ПЕНИ*, 2, 1-112.
2. Дрейпер, Д., Скотт, Р., Армитидж, Ф., Дьюри, Г., Джэкоб, Л., Уолден, Р., ... & Джефферсон, Р. (1991). *Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. Учебное издание*. Мир.
3. Митяев, М. В., Корсун, С. А., Стрелков, П. П., & Матишов, Г. Г. (2008). Древние береговые линии Восточного Кильдина. *Доклады Академии наук* 423(4), 546-550.
4. Харди, Д. С., Рено, К. Б., Пономаренко, В. П., Мухина, Н. В., Ярагина, Н. А., Шеросен, Й. Е., & Хатчингс, Д. А. (2008). Изоляция популяций атлантической трески *Gadus morhua* (Gadiformes) в северных меромиктических озёрах – повторяющийся в Арктике феномен. *Вопросы ихтиологии*, 48(2), 179-190.
5. Aarbakke, O. N. S., Bucklin, A., Halsband, C., & Norrbin, F. (2011). Discovery of *Pseudocalanus moultoni* in Northeast Atlantic waters based on mitochondrial COI sequence variation. *Journal of Plankton Research*, 33(10), 1487-1495.
6. Aarbakke, O. N. S., Bucklin, A., Halsband, C., & Norrbin, F. (2014). Comparative phylogeography and demographic history of five sibling species of *Pseudocalanus* (Copepoda: Calanoida) in the North Atlantic Ocean. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 461, 479-488.
7. Abboud, S. S., Daglio, L. G., & Dawson, M. N. (2018). A global estimate of genetic and geographic differentiation in macromedusae implications for identifying the causes of jellyfish blooms. *Marine Ecology Progress Series*, 591, 199-216.
8. Andreev, V., Fokin, M., Mugue, N., & Strelkov, P. (2015). Long-term persistence and evolutionary divergence of a marine fish population with a very small effective population size (Kildin cod *Gadus morhua kildinensis*). *Marine Biology*, 162(5), 979-992.
9. Becking, L. E., de Leeuw, C. A., Knegt, B., Maas, D. L., De Voogd, N. J., Suyatna, I., & Peijnenburg, K. T. (2016). Highly divergent mussel lineages in isolated Indonesian marine lakes. *PeerJ*, 4, e2496.
10. Bromham, L. (2009). Why do species vary in their rate of molecular evolution? *Biology letters*, 5(3), 401-404.

11. Bucklin, A., Frost, B., Bradford-Grieve, J., Allen, L., & Copley, N. (2003). Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. *Marine Biology*, 142(2), 333-343.
12. Castellani, C., & Edwards, M. (Eds.). (2017). *Marine Plankton: A Practical Guide to Ecology, Methodology, and Taxonomy*. Oxford University Press.
13. Clague, D. A., & Gillespie, R. G. (Eds.). (2009). *Encyclopedia of islands*. University of California Press.
14. Costa, F. O., DeWaard, J. R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Hajibabaei, M., & Hebert, P. D. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(2), 272-295.
15. Dawson, M. N. (2005). Five new subspecies of *Mastigias* (Scyphozoa: Rhizostomeae: Mastigiidae) from marine lakes, Palau, Micronesia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(3), 679-694.
16. Dawson, M. N. (2005). Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *Journal of Biogeography*, 32(3), 515-533.
17. Dawson, M. N., & Hamner, W. M. (2005). Rapid evolutionary radiation of marine zooplankton in peripheral environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 9235-9240.
18. Gotoh, R. O., Chiba, S. N., Goto, T. V., Tamate, H. B., & Hanzawa, N. (2011). Population genetic structure of the striped silverside, *Atherinomorus endrachtensis* (Atherinidae, Atheriniformes, Teleostei), inhabiting marine lakes and adjacent lagoons in Palau: marine lakes are “Islands” for marine species. *Genes & genetic systems*, 86(5), 325-337.
19. Gotoh, R. O., Sekimoto, H., Chiba, S. N., & Hanzawa, N. (2009). Peripatric differentiation among adjacent marine lake and lagoon populations of a coastal fish, *Sphaeramia orbicularis* (Apogonidae, Perciformes, Teleostei). *Genes & genetic systems*, 84(4), 287-295.
20. Hall, T. (1997). BioEdit: a biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT. V5. 0.9 Available from <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

21. Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
22. Hamner, W. M. (1982). Strange world of Palau's salt lakes. *National geographic*, 161(2), 264-282.
23. Hardie, D. C., Gillett, R. M., & Hutchings, J. A. (2006). The effects of isolation and colonization history on the genetic structure of marine-relict populations of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Canadian Arctic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(8), 1830-1839.
24. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
25. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
26. Lait, L. A., Marshall, H. D., & Carr, S. M. (2018). Phylogeographic mitogenomics of Atlantic cod *Gadus morhua*: Variation in and among trans-Atlantic, trans-Laurentian, Northern cod, and landlocked fjord populations. *Ecology and evolution*, 8(13), 6420-6437.
27. Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
28. Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
29. Maas, D. L., Prost, S., Bi, K., Smith, L. L., Armstrong, E. E., Aji, L. P., ... & Becking, L. E. (2018). Rapid divergence of mussel populations despite incomplete barriers to dispersal. *Molecular ecology*, 27(7), 1556-1571.
30. Markhaseva, E. L., Abramova, A. A., & Mingazov, N. D. (2012). *Pseudocalanus acuspes* (Crustacea: Copepoda) from the White Sea. *Proceedings ZIN*, 316, 57-70.
31. Mayr, E. (1954). Change of genetic environment and evolution. In: *Evolution as a Process*, edited by J. Huxley, A. C. Hardy and E. B. Ford. Allen & Unwin, London.

32. McLaren, I. A. (1969). Population and production ecology of zooplankton in Ogac Lake, a landlocked fiord on Baffin Island. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 26(6), 1485-1559.
33. Meyer, C. P., Geller, J. B., & Paulay, G. (2005). Fine scale endemism on coral reefs: archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution*, 59(1), 113-125.
34. Novikov, G. G., Afanas'ev, K. I., Rubtsova, G. A., & Stroganov, A. N. (2006). Some genetic parameters of Kildin cod *Gadus morhua kildinensis* (Gadidae, Gadiformes). *Journal of Ichthyology*, 46(8), 674-676.
35. Orsini, L., Vanoverbeke, J., Swillen, I., Mergeay, J., & De Meester, L. (2013). Drivers of population genetic differentiation in the wild: isolation by dispersal limitation, isolation by adaptation and isolation by colonization. *Molecular ecology*, 22(24), 5983-5999.
36. Nei, M., & Saitou, N. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
37. Schroth, W., Jarms, G., Streit, B., & Schierwater, B. (2002). Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology*, 2(1), 1.
38. Skazina, M., Gagarina, A., Shunatova, N., Strelkov, P. C., Simon, A. C., & Bierne, N. (2018). Landlocked population of blue mussels *Mytilus edulis* L. with extraordinary operational sex ratio, 25%F:75%M. *Marine Evolution 2018. A Marcus Wallenberg Symposium; Abstract Book. Strömstad, Sweden, May 15-17, 2018*. University of Gothenburg.
39. Stock, J. H., Iliffe, T. M., & Williams, D. (1986). The concept 'anchialine' reconsidered. *Stygologia*, 2(1/2), 90-92.
40. Strelkov, P., Nikula, R., & Väinölä, R. (2007). *Macoma balthica* in the White and Barents Seas: properties of a widespread marine hybrid swarm (Mollusca: Bivalvia). *Molecular ecology*, 16(19), 4110-4127.
41. Strelkov, P., Shunatova, N., Fokin, M., Usov, N., Fedyuk, M., Malavenda, S., ... & Korsun, S. (2014). Marine lake Mogilnoe (Kildin Island, the Barents Sea): one hundred years of solitude. *Polar biology*, 37(3), 297-310.
42. Stroganov, A. N., Afanasiev, K. I., Rubtsova, G. A., Rakitskaya, T. A., & Semenova, A. V. (2011). Data on variation of microsatellite loci in Kildin cod *Gadus morhua kildinensis* (Gadidae). *Journal of ichthyology*, 51(7), 500.

43. Strøm, K. M. (1936). *Land-locked Waters: Hydrography and Bottom Deposits in Badly-ventilated Norwegian Fjords, with Remarks Upon Sedimentation Under Anaërobic Conditions* (No. 7). Dybwad
44. Teterina, A. A., & Zhivotovsky, L. A. (2016). Genomic testing of landlocked Kildin cod (*Gadus morhua kildinensis*) for its ancestral state: stationary or migratory ecotype? (No. e2497v1). *PeerJ Preprints*.
45. Wilson, E. O., & MacArthur, R. H. (1967). *The theory of island biogeography*. Princeton, NJ.
46. Zhivotovsky, L. A., Teterina, A. A., Mukhina, N. V., Stroganov, A. N., Rubtsova, G. A., & Afanasiev, K. I. (2016). Effects of genetic drift in a small population of Atlantic cod (*Gadus morhua kildinensis* Derjugin) landlocked in a meromictic lake: genetic variation and conservation measures. *Conservation genetics*, 17(1), 229-238.